
Sexaje molecular en Psitacidae

Bertha Ludeña y Jean-Christophe Pintaud

Laboratorio de Genética Molecular de Eucariotes

Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Apartado 17-01-2184 Quito-Ecuador

bludena@puce.edu.ec

Recibido el 13 de febrero 2006 y aprobado 30 de julio 2006

RESUMEN. Un alto porcentaje de especies de aves son sexualmente monomórficas, por lo que la determinación sexual es importante tanto para la reproducción en cautiverio así como para el establecimiento de programas de conservación y manejo de especies en peligro.

En el presente trabajo se aplicó una técnica de sexaje molecular, inicialmente descrita para el género *Ara*, a otros cuatro géneros de Psitácidos: *Pionus*, *Pionites*, *Amazona* y *Aratinga*. El método consistió en el análisis de patrones de restricción de ADN generados por las enzimas HaeIII y DdeI en una región de los genes *CHDIZ* y *CHDIW*.

Individuos analizados mediante esta técnica fueron apareados y tuvieron descendencia.

La técnica de sexaje molecular usada en este estudio fue eficiente, rápida, sencilla y no agresiva para los individuos analizados.

PALABRAS CLAVE. Enzimas de restricción HaeIII y DdeI, genes *CHDIZ* y *W*, Psitacidae, sexaje molecular.

ABSTRACT. Molecular sexing in Psitacidae. A great percentage of bird species are sexually monomorphic. Sex determination is important for breeding in captivity and for programmes of *in situ* conservation and management of rare or threatened species.

We applied a molecular sexing technique, initially described for the genus *Ara*, to four other Psitacidae genera : *Pionus*, *Pionites*, *Amazona* and *Aratinga*. The method consists in the analysis of DNA restriction patterns generated by HaeIII and DdeI enzymes on a region of chromo helicase binding genes Z and W (*CHDIZ* and *CHDIW*).

Individuals sexed by this technique were mated and had offspring.

The molecular sexing technique used in this study was effective, fast, simple and not distressing for Psitacides.

KEYWORDS. *CHDIZ* and *W* genes, molecular sexing, Psitacidae, restriction enzymes HaeIII and DdeI.

ca muestran que estos genes son altamente conservados pero que han surgido ciertas diferencias que pueden ser explotadas para realizar sexaje molecular.

Bermúdez-Humarán *et al.*, (9) propusieron una nueva técnica para realizar determinación sexual en el género *Ara* basados en el análisis de diferencias nucleotídicas entre los genes *CHDI W* y *Z*. Así, amplificaron un fragmento de PCR de 110 bp del gen *CHDI* utilizando información previamente reportada por Griffiths y Tiwari (10). Posteriormente secuenciaron esta región y determinaron la presencia de algunas diferencias nucleotídicas en las secuencias de *CHDIW* y *CHDIZ* que pueden ser reconocidas por las enzimas de restricción *XhoI*, *DdeI* y *HaeIII*. La información proveniente del análisis con las últimas dos tendría mucha utilidad en el sexaje.

De este modo, se estableció que el corte con *HaeIII* genera dos bandas en los individuos machos, una de 65 bp y otra de 45 bp, debido a que su sitio de reconocimiento se localiza en el gen *CHDIZ*. En las hembras, al no existir sitio de reconocimiento para el corte, se observa una banda de 110 pb proveniente del gen *W* y dos bandas de 65 y 45 bp resultantes de la restricción del gen *CHDIZ*.

La enzima de restricción *DdeI* tiene un sitio de reconocimiento en el gen *CHDIW* y su corte genera dos frag-

mentos de 80bp y 30bp, de modo que el patrón de restricción para la hembra está estructurado por tres bandas de: 110bp (*CHDIZ*) y 80bp y 30bp (*CHDIW*). En los machos, la restricción con *DdeI* no afecta al fragmento de 110 bp correspondiente al producto de PCR, debido a que no existe un sitio de corte en *CHDIZ*.

En el presente trabajo, las secuencias *CHD* fueron reanalizadas con el programa Gene Quest de Lasergene (DNASTar, Inc.) (11), con el objetivo de determinar exactamente la longitud del fragmento *CHD* amplificado por Bermúdez-Humarán *et al.* (9) así como de los fragmentos de restricción *HaeIII* y *DdeI* generados a partir del mismo.

Con esta información esclarecida, se procedió a evaluar la aplicación de la técnica reportada previamente para *Ara* (9), para sexar aves de los géneros *Aratinga*, *Amazona*, *Pionus* y *Pionites*; además individuos del género *Ara* fueron sexados como referencia positiva.

Los resultados obtenidos fueron determinantes para establecer parejas y obtener descendencia.

MATERIALES Y METODOS

Muestras biológicas

Se trabajó con individuos de los géneros *Pionus* (10), *Pionites* (1), *Aratinga* (1), *Amazona* (3) y *Ara* (3), a los cuales se extrajo aproximadamente 300µl de sangre por venopuntura braquial.

Extracción de DNA

El DNA total fue extraído, a partir de sangre, mediante shock hipotónico y digestión 'overnight' con proteinasa K en presencia de SDS. Posteriormente se procedió a una doble extracción con CIA 24:1 y a la precipitación de los ácidos nucleicos en etanol al 100%. El ADN fue capturado mediante pesca con una microvarilla de vidrio.

Amplificación mediante PCR de una región de *CHD*

Un fragmento de 111pb de los genes *CHD Z* y *W* fue amplificado mediante PCR utilizando los primeros P2 5'CTCTGCATCGCTAAATCCTTT3' y P3 5'AGATATTTCTGGATCTGATAGTGA3'(10). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción final de 12,5ml conteniendo 30ng de DNA genómico, buffer FailSafe premix E 1X (Epicentre, Madison,USA), primers P2 y P3 1,6 µM y 1,25U de Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% y luego purificados usando el kit Qiaquick PCR purification (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Análisis con enzimas de restricción

Las digestiones enzimáticas HaeIII y DdeI fueron realizadas en un volumen final de 20ml, de acuerdo a los protocolos standard de digestión para enzimas de restricción y los fragmentos genera-

dos fueron visualizados en geles de agarosa al 3,5%. El registro de la información se efectuó mediante fotografía digital.

Análisis de la secuencia *CHD*

La secuencia *CHD* fue analizada mediante el módulo Gene Quest del programa Lasergene (11) que permitió realizar la simulación de digestión con HaeIII y DdeI y establecer longitudes exactas de los fragmentos a obtenerse.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la secuencia del gen *CHD* amplificada por Bermúdez-Humarán *et al.* (9), utilizando Gene Quest (11), precisó que la longitud exacta del fragmento amplificado es de 111bp y que los fragmentos de digestión con HaeIII son 66 y 45 bp respectivamente, mientras que la digestión con DdeI produce fragmentos de 78 y 33 bp (Figura 1).

La acción de restricción de las enzimas HaeIII y DdeI en una región de 111pb de los genes *CHD Z* y *W* en psitácidos, analizada en el presente trabajo, permitió caracterizar sexualmente a los individuos estudiados. Los patrones de restricción inicialmente descritos para *Ara* (9) fueron obtenidos en todos los especímenes analizados (géneros *Pionus*, *Pionites*, *Amazona* y *Aratinga*) (Figuras 2 y 3), confirmando que la misma divergencia de secuencia se ha mantenido en los parálogos *CHDZ* y *W* en los géneros *Ara*, *Pionus*, *Pionites*, *Amazona* y *Aratinga*.

Extracción de DNA

El DNA total fue extraído, a partir de sangre, mediante shock hipotónico y digestión 'overnight' con proteinasa K en presencia de SDS. Posteriormente se procedió a una doble extracción con CIA 24:1 y a la precipitación de los ácidos nucleicos en etanol al 100%. El ADN fue capturado mediante pesca con una microvarilla de vidrio.

Amplificación mediante PCR de una región de *CHD*

Un fragmento de 111pb de los genes *CHD Z* y *W* fue amplificado mediante PCR utilizando los primeros P2 5'CTCTGCATCGCTAAATCCTTT3' y P3 5'AGATATTTCTGGATCTGATAGTGA3'(10). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción final de 12,5ml conteniendo 30ng de DNA genómico, buffer FailSafe premix E 1X (Epicentre, Madison, USA), primers P2 y P3 1,6 µM y 1,25U de Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% y luego purificados usando el kit Qiaquick PCR purification (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Análisis con enzimas de restricción

Las digestiones enzimáticas HaeIII y DdeI fueron realizadas en un volumen final de 20ml, de acuerdo a los protocolos standard de digestión para enzimas de restricción y los fragmentos genera-

dos fueron visualizados en geles de agarosa al 3,5%. El registro de la información se efectuó mediante fotografía digital.

Análisis de la secuencia *CHD*

La secuencia *CHD* fue analizada mediante el módulo Gene Quest del programa Lasergene (11) que permitió realizar la simulación de digestión con HaeIII y DdeI y establecer longitudes exactas de los fragmentos a obtenerse.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la secuencia del gen *CHD* amplificada por Bermúdez-Humarán *et al.* (9), utilizando Gene Quest (11), precisó que la longitud exacta del fragmento amplificado es de 111bp y que los fragmentos de digestión con HaeIII son 66 y 45 bp respectivamente, mientras que la digestión con DdeI produce fragmentos de 78 y 33 bp (Figura 1).

La acción de restricción de las enzimas HaeIII y DdeI en una región de 111pb de los genes *CHD Z* y *W* en psitácidos, analizada en el presente trabajo, permitió caracterizar sexualmente a los individuos estudiados. Los patrones de restricción inicialmente descritos para *Ara* (9) fueron obtenidos en todos los especímenes analizados (géneros *Pionus*, *Pionites*, *Amazona* y *Aratinga*) (Figuras 2 y 3), confirmando que la misma divergencia de secuencia se ha mantenido en los parálogos *CHDZ* y *W* en los géneros *Ara*, *Pionus*, *Pionites*, *Amazona* y *Aratinga*.

En lo referente al aspecto técnico es importante señalar que se trata de una metodología sencilla, rápida y no agresiva para la determinación del sexo en psitácidos. Además, considerando que los resultados obtenidos fueron funda-

mentales para establecer parejas y obtener descendencia, se recomienda la utilización de la misma con fines de conservación.

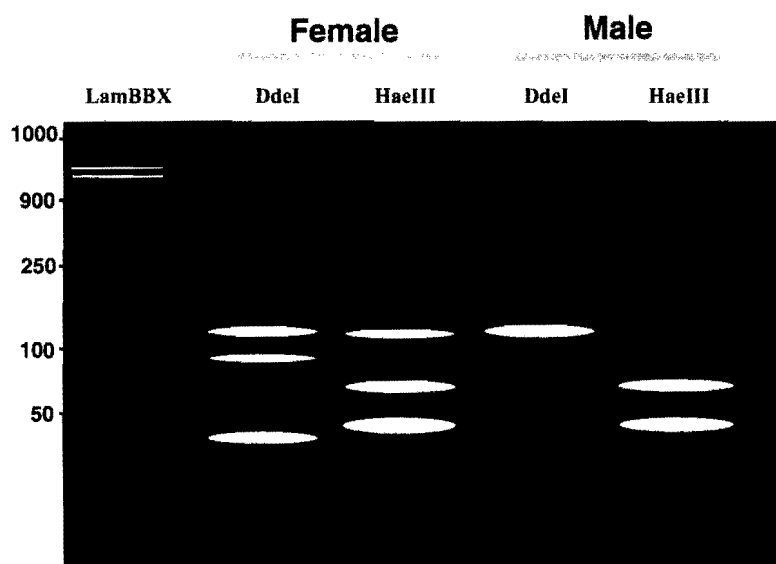


Figura 1. Simulación del patrón de restricción para HaeIII y DdeI para los genes *CHDI Z* y *W* generado con el programa GeneQuest (machos: ZZ, hembras ZW). El gen W posee un sitio de restricción DdeI que determina un patrón de 3 bandas para la hembra (111, 78 y 33 pares de bases) y una banda para el macho (111 pares de bases). El gen Z posee un sitio HaeIII que genera un patrón de digestión de 3 bandas para las hembras (111, 66 y 45 pares de bases) y de dos 2 bandas para los machos (66 y 45 pares de bases respectivamente).

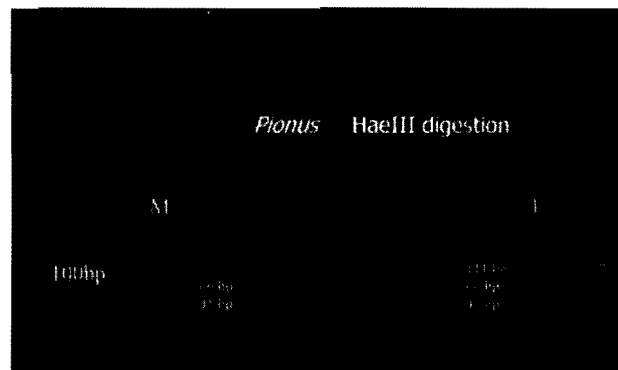


Figura 2. Digestión de los genes *CHDI* con la enzima *HaeIII* en *Pionus*. Los machos (M) exhiben un patrón de dos bandas (66 y 45 bp) mientras que las hembras (F) muestran un patrón de tres bandas correspondientes a un fragmento no digerido del gen ubicado en el cromosoma W (111bp) y los fragmentos esperados de 66 y 45 bp del gen localizado en el cromosoma Z.

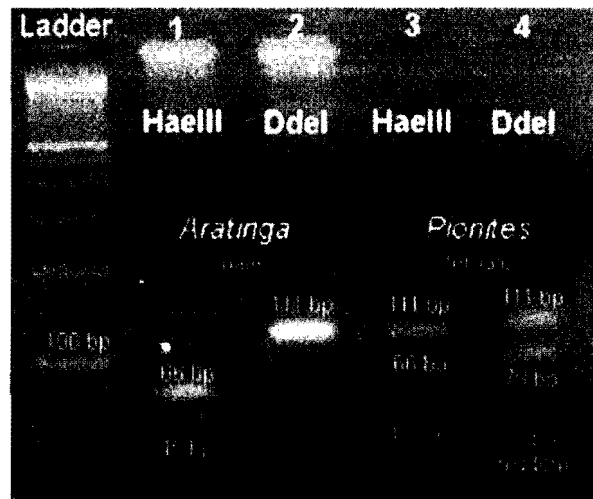


Figura 3. Restricción *HaeIII* y *DdelI* de los genes *CHD* en *Aratinga* y *Pionites*. Los productos de restricción *HaeIII* para un individuo *Aratinga* son dos bandas de 66 y 45bp. La restricción con la enzima *DdelI* no afectó el producto de PCR de 111pb. Se concluye entonces que se trata del genoma de un macho. El tratamiento con *DdelI* en un individuo *Pionites* generó tres bandas de: 111, 78 y 33bp (esta última coincide con el colorante en la foto). Al realizar la digestión *HaeIII* en este individuo se obtuvieron también 3 bandas de 111,66 y 45 pb. Estos resultados evidencian la presencia de los genes *CHDZ* y *W*, por lo que este *Pionites* puede ser considerado como una hembra.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Juan Carlos Escobar por su colaboración en la revisión bibliográfica previa a la realización de este trabajo, a Jean-Louis Zeddard por su ayuda con los protocolos de digestión y a Tjitte de Vries por los comentarios del manuscrito preliminar.

REFERENCIAS

1. ELLEGREN, H. First gene on the avian W chromosome (*CHD*) provides a tag for universal sexing for non ratite birds. *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 1996; **263**: 1635–1644.
2. GRIFFITHS, R.; DAAN, S. & DIJKSTRA, C. Sexing identification in birds using two *CHD* genes. *Proceedings of the Royal Society of London B.*, 1996; **263**: 1249–1254.
3. GRIFFITHS, R. & KORN, R. A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene*, 1997; **197**: 225–229.
4. DELMAS, V.; STOKES, D. & PERRY, R. A mammalian DNA binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SW12 – like helicase domain. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. 1993; **90**: 2414 –2418.
5. STOKES, D. G. & PERRY, R. DNA-binding and chromatin localization properties of *CHD1*. *Molecular Cell Biology*, 1995; **5**: 2745–2753.
6. STOKES, D. G.; TARTOF, K. & PERRY, R. *CHD1* is concentrated in interbands and puffed regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 1996; **93**: 7137–7142.
7. AGATE, R.; CHOE, M. & ARNOLD, A. Sex differences in structure and expression of the sex chromosome genes *CHD1Z* and *CHDW* in Zebra Finches. *Molecular Biology and Evolution*, 2004; **21**: 384–396.
8. FRIDOLFSSON, A. K. & ELLEGREN, H. Molecular Evolution of the Avian *CHD1* genes on the Z and W Sex Chromosomes. *Genetics*, 2000; **155**: 1903–1912.
9. BERMÚDEZ-HUMARÁN, L-G; GARCÍA, A.; LEAL-GARZA, C.; RIOJAS-VALDES, V.; JARAMILLO-RANGEL, G. & MONTES DE OCA LUNA, R. Molecular Sexing of Monomorphic Endangered birds. *Journal of Experimental Zoology*. 2002; **292**: 677–680.
10. GRIFFITHS, R. & TIWARI, B. Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*, 1995; **375**: 474.
11. Lasergene, version 5. DNASTAR, INC. 200. Madison, Wisconsin, USA.